（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!）

免疫(共)沉淀(IP/CoIP)试剂盒(磁珠法)

IP/CoIP Kit(Magnetic bead)

产品货号：EA-IP-K007M

产品规格：50 T

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：techsupport@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

背景信息

本产品由高品质的 Protein A/G 与磁珠共价偶联制成，可用于免疫沉淀（IP）和免疫共沉淀（Co-IP）。本产品具有高载量，操作迅速便捷，特异性强，非特异性吸附低，可结合范围广等特点。

性能指标

1. 应用范围：

来源于细胞裂解液、细胞分泌液上清、血清、动物腹水等样品的多个物种的 IgG 类蛋白质（包含大部分 IgG 亚型）的免疫（共）沉淀（见附件）。

2. 偶联物属性：

高纯度的重组 Protein A/G。

3. 磁珠属性：

磁珠颗粒，平均粒径 3μm。

4. 磁珠载量：

1mL 超顺磁珠，共价偶联 20mg 重组 Protein A/G。

5. 主要成分：

0.5mL Protein A/G 免疫磁珠，保存于 1.5mL 含防腐剂的 PBS 中。

产品组分

组分名称	组分编号	规格	保存方法
细胞裂解液 Lysis buffer	L1	30 mL	4℃,12 个月
磁力架（四孔） Magnetic frame	C	1 个	室温,12 个月
ProteinA/G 磁珠 Protein A/G Magnetic Beads	G1	2 mL	4℃,12 个月
酸性洗脱液 Acid elution buffer	E3	2 mL	4℃,12 个月
PBS Buffer, pH7.4 (10×)	P10	50 mL	4℃,12 个月
PBST Buffer,pH7.4 (10×)	P10T	50 mL	4℃,12 个月
说明书一份			

注意事项

1. **运输和保存：**

   本试剂盒在冷藏条件下运输。

   收货后请将磁力架 **C** 取出，室温保存；试剂盒其它成分保存于 4℃。

2. **试剂使用建议：**

   10×PBS、10×PBST 使用前需用去离子水稀释成 1×工作液。

3. **ProteinA/G 磁珠使用建议：**

   混匀磁珠时，请采用柔和涡旋，上下颠倒，及摇床混匀等方法。勿离心、干燥磁珠，勿使用超声处理磁珠，酸处理磁珠时间勿超过 10min。

4. **酸性洗脱液选择：**

   有文献显示，与传统的 Glycine-HCL 洗脱液相比，本试剂盒提供的 pH 3.0 的 Arginine-HCL 做为洗脱液，可以减少蛋白质变性。您也可以根据实际情况自行选用酸性洗脱液。

5. **Protein A/G 与各物种 IgG 结合的亲和力：**

   各物种的抗体（IgG, IgM, IgA, IgD）与 Protein A/G 结合亲和力不同，使用请认真阅读本说明书附件。

试剂配制

1. **1× PBS**

   按照 9:1 的比例用去离子水将 10×PBS 稀释待用，例如：1mL **P10** 加入 9mL 去离子水，混匀后即为 1× PBS。现用现配。

2. **1× PBST**

   按照 9:1 的比例用去离子水将 10×PBST 稀释待用，例如：1mL **P10T** 加入 9mL 去离子水，混匀后即为 1× PBST。现用现配。

使用方法

注：所有步骤尽可能在冰上进行，以避免目标蛋白质降解。以下操作步骤，使用磁珠悬液用量为 40μL（含 10μL 磁珠），可从 15μL 血清或者 100μL 细胞上清中结合 20μg IgG，请根据待结合抗体量，调节磁珠使用量。

1. 细胞裂解液制备

1) 收集细胞

悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后转入离心管中，1000rpm，4℃离心 5min，弃上清。

贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来，连同培养基转入离心管中，1000rpm，4℃离心 5min，弃上清。

2) 用预冷至 4℃的 1×PBS 重悬细胞，1000rpm，4℃离心 3min，弃上清。重复 1 次。

3) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液 **L1**，反复吹打后冰上放置 10~20min。

注：一般 1mL 细胞裂解液可以处理约 0.5~1×10^7 个细胞。为了避免目标蛋白质降解，需要添加蛋白酶抑制剂（PMSF 工作浓度：0.1~1.0mmol/L）。

4) 用超声破碎仪处理细胞裂解液，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。冰上放置 30min 之后，12000rpm，4℃离心 10min。取上清即为蛋白样本。建议立即进行下一步实验，若时间不允许，置于-80℃保存。

注：若无超声破碎仪，也可使用削成斜口的枪头或注射器反复吹吸，直至细胞裂解液透明，不再粘稠。

5) 若目标蛋白是分泌表达的，不需要上述处理，直接收集培养基上清，浓缩后即可进行以下步骤。如果目标蛋白质含量较高，建议用 1×PBS 稀释样品至目标蛋白质终浓度为 10-100μg/mL。

2. 抗体与磁珠孵育

1) Protein A/G 磁珠的准备：
将磁珠充分混悬，取 40μL 磁珠悬液（含 10μL 磁珠），置于离心管中，加入 500μL 1× PBS，充分混悬，置于磁力架上，磁性分离，弃上清；重复此洗涤步骤 2 次
2) 抗体准备：根据抗体说明书推荐的 IP 稀释比，用 1×PBS 稀释抗体，配制成抗体工作液，将抗体总体积调整至 500μL。置于冰上备用。
3) 将稀释好的抗体加入预洗好的磁珠，轻柔混匀，在摇床上室温孵育 30 min。
4) 磁性分离，转移上清液至新的离心管中，以备后续使用。
5) 向磁珠中加入 500μL 1×PBS，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复 4 次。得到抗体-磁珠复合物。

3. 目标蛋白与抗体-磁珠复合物结合

1) 孵育：在抗体-磁珠复合物中加入 400μL 准备好的样本，摇床上室温孵育 30 min，也可 4℃孵育 2h 或更长时间。
2) 孵育完毕后，磁性分离，取上清液至新的离心管中，以便后续使用。
3) 加入 500μL 1×PBST，温和混匀，清洗磁珠，磁性分离，弃上清。重复 4 次。

4. 目标蛋白洗脱

本说明书提供以下两种目标蛋白洗脱方案，请根据后期检测的需要选择不同的目标蛋白洗脱方法。

1) 变性洗脱法：此方法洗脱的样品，适用于 SDS-PAGE 检测。
步骤：分离磁珠，弃上清，向磁珠中加入 40uL 1×PBS 和 10μL 5×上样缓冲液，混合均匀，95°C 煮样 5 min。分离磁珠，收集上清，进行 SDS-PAGE 检测。
2) 酸性洗脱法：此方法洗脱的目标蛋白，可用于后期功能分析。
步骤：分离磁珠，弃上清，向磁珠中加入 50~100μL 酸性洗脱液，室温孵育 10 min；分离磁珠，收集上清至新的离心管，并立即滴入总体积 1/10 体积的 10×PBS 缓冲液，将洗脱产物 pH 调节至中性，样品用于后期功能分析。

附件

Protein A/G 与各物种 IgG 结合的亲和力

Human	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
	IgG3	+++++
	IgG4	+++++
	IgM	+
	IgD	-
	IgA	+
	IgE	+++
	Fab	+
	ScFv	+
Mouse	Total IgG	+++++
	IgM	-
	IgG1	+++
	IgG2a	+++++
	IgG2b	+++++
	IgG3	+++++
Rat	Total IgG	+++
	IgG1	+++
	IgG2a	+++++
	IgG2b	+
	IgG2c	+++++

Cow	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
Goat	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
Shhep	Total IgG	+++++
	IgG1	+++++
	IgG2	+++++
Horse	Total IgG	+++++
	IgG(ab)	+
	IgG(c)	+
	IgG(T)	+++++
Rabbit	Total IgG	+++++
Guinea Pig	Total IgG	+++++
Hamster	Total IgG	+++
Pig	Total IgG	+++++
Donkey	Total IgG	+++++
Cat	Total IgG	+++++
Dog	Total IgG	+++++
Chicken	Total IgY	-
Monkey	Total IgG	+++++

声明

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究使用。
2. 请注意安全事项，遵守实验室试剂操作规范操作。
3. 本试剂盒提供的裂解液是经过长时间反复优化的配方，经过大量实验验证。处理细胞时，建议使用本试剂盒配套的裂解液，其他厂家提供的裂解液可能影响蛋白纯化或者后续 IP 实验结果。